

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2000年12月21日 (21.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/77219 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/48,
C12Q 1/68, 1/70, G01N 33/569, 33/50
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03896
- (22) 国際出願日: 2000年6月15日 (15.06.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/167736 1999年6月15日 (15.06.1999) JP
特願2000/23581 2000年2月1日 (01.02.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO.,

LTD.) [JP/JP]; 〒101-8535 東京都千代田区神田司町
2丁目9番地 Tokyo (JP). 学校法人 慶應義塾 (KEIO
UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒153-0062 東京都港区三田2
丁目15番45号 Tokyo (JP).

- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤真吾
(KATO, Shingo) [JP/JP]; 〒177-0031 東京都練馬区
三原台1-33-13 Tokyo (JP). 小林芳夫 (KOBAYASHI,
Yoshio) [JP/JP]; 〒157-0066 東京都世田谷区成城
4-3-21 ローゼンハイム102 Tokyo (JP). 平石佳之
(HIRAISHI, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒203-0054 東京都
東久留米市中央町1-15-22 Tokyo (JP). 清水香代子
(SHIMIZU, Kayoko) [JP/JP]; 〒224-0037 神奈川県横
浜市都筑区茅ヶ崎南4-15-1-807 Kanagawa (JP). 杉田

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING HIV-1 SUBTYPE

(54) 発明の名称: HIV-1のサブタイプ決定法

a アブタイプA TGTATaccctCagccatTACAcAgGCTGTCCaAAGgTatCCTTTGAgCCaATTCCCA

b アブタイプB

c アブタイプC

d アブタイプD

e アブタイプE

f アブタイプF

g アブタイプG

h アブタイプH

a アブタイプA caTTATGtgCCcCaGCTGGtTtGCGATTCTAAAgTGTtAa?gataagggagTTcaatGGA

b アブタイプB

c アブタイプC

d アブタイプD

e アブタイプE

f アブタイプF

g アブタイプG

h アブタイプH

a アブタイプA acAGGccatGcaggaAATGTCAAGCaCaGTaCAATGcACacATGGaATcAagCCAGtagTa

b アブタイプB

c アブタイプC

d アブタイプD

e アブタイプE

f アブタイプF

g アブタイプG

h アブタイプH

a アブタイプA tCAACTCAACTgctGTtAATGGcAGtctTAGCAGaAgaa???gaggtAatgaTtagATCT

b アブタイプB

c アブタイプC

d アブタイプD

e アブタイプE

f アブタイプF

g アブタイプG

h アブタイプH

a アブタイプA gAaaataTcachaAcaATgcccasaAoccaTaaTaGTacAgGCTtg?aaagcctGTaa?aAtt

b アブタイプB

c アブタイプC

d アブタイプD

e アブタイプE

f アブタイプF

g アブタイプG

h アブタイプH

a アブタイプA aattGT

b アブタイプB

c アブタイプC

d アブタイプD

e アブタイプE

f アブタイプF

g アブタイプG

h アブタイプH

a...SUBTYPE A e...SUBTYPE E

b...SUBTYPE B f...SUBTYPE F

c...SUBTYPE C g...SUBTYPE G

d...SUBTYPE D h...SUBTYPE H

(57) Abstract: A method for determining a subtype of HIV-1 characterized by comprising effecting a nucleic acid amplification reaction acid by using, as a target sequence, a part of the nucleotide sequence of HIV-1 env gene, wherein at least one of the 5'-terminal and 3'-terminal nucleotide sequences differs from subtype to subtype of HIV-1, and detecting the subtype depending on the occurrence of the nucleic acid amplification; and a kit for determining a subtype of HIV-1 containing a pair of primers the target sequence of which is a part of the nucleotide sequence of HIV-1 env gene wherein at least one of the 5'-terminal and 3'-terminal nucleotide sequences differs from subtype to subtype of HIV-1.

[続葉有]



哲佳 (SUGITA, Tetsuyoshi) [JP/JP]; 〒164-0012 東京都
中野区本町2-28-7-303 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(74) 代理人: 三枝英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒541-
0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル
Osaka (JP).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

(81) 指定国 (国内): CA, US.

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、H I V - 1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列の一部であって、5' 末端部および 3' 末端部のうちの少なくとも片方のヌクレオチド配列が H I V - 1 のサブタイプにより異なる一部を標的配列として核酸の増幅反応を行い、核酸の増幅の有無によりサブタイプの検出を行うことを特徴とする、H I V - 1 のサブタイプを決定する方法に関する。また、本発明は H I V - 1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列の一部であって、5' 末端部および 3' 末端部のうちの少なくとも片方のヌクレオチド配列がサブタイプにより異なる一部を標的配列とするプライマー対を含む、H I V - 1 のサブタイプを決定するためのキットに関する。

1

明細書

H I V - 1 のサブタイプ決定法

技術分野

本発明は、H I V - 1 のサブタイプ決定法およびH I V - 1 のサブタイプを決定するためのキットに関する。

背景技術

ヒト免疫不全ウイルス（以下、「H I V」と記す。）は、後天性免疫不全症候群（以下、「A I D S」と記す。）の原因ウイルスで、1型（H I V - 1）と2型（H I V - 2）が知られている。このうち、症例が多く、種々のサブタイプが見つかったのは、H I V - 1である。

感染個体内のH I V - 1 のサブタイプを決定することは、ウイルス学的検査結果（特に血漿H I V - 1 R N A濃度や遺伝型による薬剤耐性）の信頼性や、感染経路を推測するために重要である。一般にH I V - 1 のサブタイプ決定はウイルスゲノムの特定領域をシークエンシングし、その結果を系統樹解析することによって判定されているが、これらの操作は煩雑で費用もかかることが問題となっていた。

従って、本発明は、より簡便なH I V - 1 のサブタイプ決定法を提供することを目的とする。

また、本発明は、H I V - 1 のサブタイプを決定するためのキットを提供することも目的とする。

図面の簡単な説明

図1は、H I V - 1 の種々のサブタイプの env 遺伝子の V3 領域の 5' 隣接領域（C2 領域）のヌクレオチド配列を示す。大文字は同じサブタイプ内でヌクレオチドが完全に共通であることを、小文字は同じサブタイプ内でヌクレオチドが異なる変異体が存在することを示す。？は変異が多すぎてコンセンサスのヌクレオチドが決められないことを示す。- はサブタイプ A と同じヌクレオチドを示す。・は相当する部位にヌクレオチドが存在しないことを示す。

図2は、H I V - 1 の種々のサブタイプの env 遺伝子の V3 領域の

2

3' 隣接領域 (C3 領域) のヌクレオチド配列を示す。大文字は同じサブタイプ内でヌクレオチドが完全に共通であることを、小文字は同じサブタイプ内でヌクレオチドが異なる変異体が存在することを示す。？は変異が多すぎてコンセンサスのヌクレオチドが決められないことを示す。- はサブタイプ A と同じヌクレオチドを示す。・ は相当する部位にヌクレオチドが存在しないことを示す。

図 3 は、H I V-1 のサブタイプを決定するための nested PCR (第一 P C R も第二 P C R もプライマーが異なる) で用いたプライマーの位置、組み合わせおよび塩基配列を示す。

図 4 は、ウイルスゲノムのシーケンシングによってサブタイプが決定されている検体について、図 3 に示したプライマーを用いた nested PCR によりサブタイプの検出を行った結果を示す。

図 5 : Location of primers in HIV-1 subtype-specific nested PCR.

図 5 は、H I V-1 のサブタイプを決定するための nested PCR (第一 P C R のプライマーは共通で第二の P C R のプライマーが異なる) で用いたプライマーの位置、組み合わせおよび塩基配列を示す。9 M はプライマー 9AE および 9B の混合物、11M はプライマー 11LAE、11LB および 11LC の混合物、12M はプライマー 12A と 12B の混合物を示す。

図 6 : Subtype-specific PCR of HIV-1 DNA.

図 6 は、図 5 に示したプライマーを用いた nested PCR によりサブタイプの検出を行った結果を示す。

図 7 : Phylogenetic analysis of HIV-1 variants.

図 7 は、シーケンシングによって得られた、env 遺伝子 V3 領域の塩基配列をもとに H I V-1 変異体の系統樹解析を行い、サブタイプを決定した結果を示す。

図 8 : Amino acid sequence in PR of non-subtype B HIV-1 in patients receiving HAART.

図 8 は、HAART 療法を受けている非サブタイプ B H I V-1 感染患者におけるプロテアーゼ阻害剤耐性に関するアミノ酸配列を示す。

図9は、各種のサブタイプとHIV-1感染患者の性行動の関係を示す表である。

図10: RT-PCR of RNA from PA⁺ but WB⁻ plasma with universal primers

図10は、粒子吸着法により陽性(PA⁺)と診断され、ウェスタンブロット法により陰性(WB⁻)と診断された被験者からの血清検体について、サブタイプに関係なくHIV-1を増幅できるプライマー対を用いたRT-PCRを行った結果を示す。N1とN2は陰性対照、P1とP2は陽性対照を示す。

発明の開示

本発明者らは、各サブタイプに特異的なプライマーを設計し、これを用いてサンプル中の核酸の増幅反応を行うことによって、HIV-1のサブタイプを迅速に決定することに成功し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、HIV-1のenv遺伝子のヌクレオチド配列の一部であって、5'末端部および3'末端部のうちの少なくとも片方のヌクレオチド配列がHIV-1のサブタイプにより異なる一部を標的配列として核酸の増幅反応を行い、核酸の増幅の有無によりサブタイプの検出を行うことを特徴とする、HIV-1のサブタイプを決定する方法を提供する。標的配列は100~2500塩基対の長さであるとしてよく、好ましくは150~500塩基対の長さである。上記の方法において、標的配列の3'末端および/または5'末端から1番目~30番目の塩基までの配列がサブタイプによって異なるとよい。例えば、標的配列の3'末端はHIV-1のenv遺伝子のC3領域にあってもよい。また、標的配列の5'末端がHIV-1のenv遺伝子のC2領域にあってもよい。異なるプライマー対を用いて異なる増幅反応を行って、異なるサブタイプを検出することができる。例えば、HIV-1のenv遺伝子のC3領域の一部のサブタイプによって異なるヌクレオチド配列(ヌクレオチド配列1)に相補的な配列を含むプライマー(プライマー1)とH

I V - 1 の env 遺伝子の C2 領域の一部のヌクレオチド配列(ヌクレオチド配列 2) に相補的な配列を含むプライマー (プライマー 2) とからなるプライマー対を用いる増幅反応を少なくとも 2 回プライマー対を変えて行い、少なくとも 2 つのサブタイプを検出することができる。

また、第一のプライマー対を用いて、H I V - 1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列の一部を標的配列とする第一の増幅反応を行った後、第二のプライマー対を用いて、前記標的配列の一部であって、5' 末端部および 3' 末端部のうちの少なくとも片方のヌクレオチド配列がサブタイプにより異なる一部を標的配列とする第二の増幅反応を行い、第二の増幅反応による核酸の増幅の有無によりサブタイプの検出を行ってもよい。例えば、第二のプライマー対が、H I V - 1 の env 遺伝子の C3 領域の一部のサブタイプによって異なるヌクレオチド配列(ヌクレオチド配列 1) に相補的な配列を含むプライマー (プライマー 1) と H I V - 1 の env 遺伝子の C2 領域の一部のヌクレオチド配列 (ヌクレオチド配列 2) に相補的な配列を含むプライマー (プライマー 2) とからなり、第一のプライマー対が、H I V - 1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列 1 の 3' 末端の下流の領域の一部のヌクレオチド配列 (ヌクレオチド配列 3) に相補的な配列を含むプライマー (プライマー 3) と H I V - 1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列 2 の 5' 末端の上流の領域の一部のヌクレオチド配列 (ヌクレオチド配列 4) に相補的な配列を含むプライマー (プライマー 4) とからなってもよい。

第一のプライマー対を用いて H I V - 1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列の一部を標的配列とする第一の増幅反応を行った後、第二のプライマー対を用いて前記標的配列の内部のヌクレオチド配列を標的配列とする第二の増幅反応を行い、第二の増幅反応による核酸の増幅の有無によりサブタイプの検出を行う一連の操作を第二のプライマー対を変えて少なくとも 1 回繰り返すことにより、少なくとも 2 つのサブタイプの鑑別を行うことができる。例えば、(a) 第一のプライマー対として、GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号 5) のヌクレオチド配列

を含むプライマー12A、ACAGTAGAAAAATTCCCCTC（配列番号6）のヌクレオチド配列を含むプライマー12B、CACAGTACAATGCACACATG（配列番号8）のヌクレオチド配列を含むプライマー9AE および CACAGTACAATGTACACATG（配列番号9）のヌクレオチド配列を含むプライマー9B の混合物を用い、第二のプライマー対として、CTCCTGAGGAGTTAGCAAAG（配列番号27）のヌクレオチド配列を含むプライマー11QA1 および CTGTTAAATGGCAGTCTAGC（配列番号20）のヌクレオチド配列を含むプライマー10Uを用いサブタイプAの検出を行い、

(b) 第一のプライマーとして、GCAATAGAAAAATTCTCCTC（配列番号5）のヌクレオチド配列を含むプライマー12A、ACAGTAGAAAAATTCCCCTC（配列番号6）のヌクレオチド配列を含むプライマー12B、CACAGTACAATGCACACATG（配列番号8）のヌクレオチド配列を含むプライマー9AE および CACAGTACAATGTACACATG（配列番号9）のヌクレオチド配列を含むプライマー9B の混合物を用い、第二のプライマー対として、CACAATTAAACTGTGCATTAC（配列番号28）のヌクレオチド配列を含むプライマー11VB および CTGTTAAATGGCAGTCTAGC（配列番号20）のヌクレオチド配列を含むプライマー10U を用いてサブタイプBの検出を行い、

(c) 第一のプライマーとして、GCAATAGAAAAATTCTCCTC（配列番号5）のヌクレオチド配列を含むプライマー12A、ACAGTAGAAAAATTCCCCTC（配列番号6）のヌクレオチド配列を含むプライマー12B、CACAGTACAATGCACACATG（配列番号8）のヌクレオチド配列を含むプライマー9AE および CACAGTACAATGTACACATG（配列番号9）のヌクレオチド配列を含むプライマー9B の混合物を用い、第二のプライマー対として、TTGTTTTATTAGGGAAGTGTTT（配列番号29）のヌクレオチド配列を含むプライマー11XC および CTGTTAAATGGTAGTCTAGC（配列番号24）のヌクレオチド配列を含むプライマー10U を用いサブタイプCの検出を行い、

(d) 第一のプライマーとして、GCAATAGAAAAATTCTCCTC（配列番号5）のヌクレオチド配列を含むプライマー12A、ACAGTAGAAAAATTCCCCTC（配列番号6）のヌクレオチド配列を含むプライマー12B、CACAGTACAATGCACACATG（配列番号8）のヌクレオチド配列を含むプライマー9AE および CACAGTACAATGTACACATG（配列番号9）のヌクレオチド配列を含むプライマー9B の混合物を用い、第二のプライマー対として、CTCCTGAGGAGTTAGCAAAG（配列番号27）のヌクレオチド配列を含むプライマー11QA1 および CTGTTAAATGGCAGTCTAGC（配列番号20）のヌクレオチド配列を含むプライマー10U を用いサブタイプDの検出を行い、

号 5) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12A、ACAGTAGAAAAATTCCTC (配列番号 6) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12B、CACAGTACAATGCACACATG (配列番号 8) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9AE および CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9B の混合物を用い、第二のプライマー対として、CTCTACAATTAATGATGCATTG (配列番号 30) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11WE および CTGTTAAATGGCAGTCTAGC (配列番号 20) のヌクレオチド配列を含むプライマー 10U を用いてサブタイプ C の検出を行うことにより、サブタイプ A、B、C および E の鑑別を行うことができる。

あるいはまた、第一のプライマー対を用いて HIV-1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列の一部を標的配列とする第一の増幅反応を行った後、第二のプライマー対を用いて前記標的配列の内部のヌクレオチド配列を標的配列とする第二の増幅反応を行い、第二の増幅反応による核酸の増幅の有無によりサブタイプの検出を行う一連の操作を第一のプライマー対および第二のプライマー対を変えて少なくとも 1 回繰り返すことにより、少なくとも 2 つのサブタイプの鑑別を行ってもよい。例えば、(a) 第一のプライマー対として、GCAATAGAAAAATTCCTC (配列番号 5) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12A および CACAGTACAATGCACACATG (配列番号 8) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9AE を用い、第二のプライマー対として、CTCCTGAGGGGTTAGCAAAG (配列番号 1) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11QA および AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号 4) のヌクレオチド配列を含むプライマー 10 を用いてサブタイプ A の検出を行い、

(b) 第一のプライマー対として、ACAGTAGAAAAATTCCTC (配列番号 6) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12B および CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9B を用い、第二のプライマー対として、CTGTGCATTACAATTTCTGG (配列番号 2) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11BB および

AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号 4) のヌクレオチド配列を含むプライマー 10 を用いてサブタイプ B の検出を行い、また、

(c) 第一のプライマー対として、GCAATAGAAAAATTCCCCTC (配列番号 7) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12E および CACAGTACAATGCACACATG (配列番号 8) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9AE を用い、第二のプライマー対として、CTCCTGAGGGTGGTTGAAAG (配列番号 3) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11QE および AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号 4) のヌクレオチド配列を含むプライマー 10 を用いてサブタイプ E の検出を行うことにより、サブタイプ A、B および E の鑑別を行うことができる。

本発明の方法は、さらに、H I V - 1 のゲノムのヌクレオチド配列の一部であって、ヌクレオチド配列がすべてのサブタイプの間で高度に保存されている一部を標的配列とする核酸の増幅反応を行い、核酸の増幅の有無により H I V - 1 の存在または不存在を確認する工程を含んでもよい。H I V - 1 の存在または不存在を確認する工程は、第一のプライマー対を用いて、H I V - 1 のゲノムのヌクレオチド配列の一部であって、ヌクレオチド配列がすべてのサブタイプの間で高度に保存されている一部を標的配列とする核酸の増幅反応を行った後、第二のプライマー対を用いて、前記標的配列の内部のヌクレオチド配列を標的配列とする第二の増幅反応を行い、核酸の増幅の有無により H I V - 1 の存在または不存在を確認することからなるとよい。ここで、第一のプライマーとして、第一のプライマーとして、GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号 5) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12A、ACAGTAGAAAAATTCCCCTC (配列番号 6) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12B、CACAGTACAATGCACACATG (配列番号 8) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9AE および CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9B の混合物を用い、第二のプライマーとして、AATTTCTGGGTCCCCTCCTG (配列番号 18) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11LB、AATTTCTAGATCCCCTCCTG (配列

番号 25) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11LAE、AATTTCTAGGTCCCCTCCTG (配列番号 26) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11LC および CTGTTAAATGGCAGTCTAGC (配列番号 20) のヌクレオチド配列を含むプライマー 10U の混合物を用いることができる。

また、本発明は、HIV-1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列の一部であって、5' 末端部および 3' 末端部のうちの少なくとも片方のヌクレオチド配列がサブタイプにより異なる一部を標的配列とするプライマー対を含む、HIV-1 のサブタイプを決定するためのキットを提供する。

以下、本発明の実施態様を詳細に説明する。

HIV-1 感染が疑われている人、HIV-1 感染が確認されている感染者もしくは患者、または抗 HIV-1 治療を受けている患者などの被験者から、血液、リンパ液、髄液、精液、リンパ節などのサンプルを採取する。採取したサンプルから、Pharmacia 社の Ficoll-Paque 密度勾配遠心を用いて単核球を分離した後か、あるいは直接 QIAGEN 社の QIAamp Blood Kit を用いて DNA を抽出する。あるいは、血漿からは、QIAGEN 社の QIAamp Viral RNA Kit を用いて RNA を抽出する。次いで、この DNA または RNA の濃度を 260 nm における吸光度から決定する。

次に、この核酸を PCR、好ましくは、nested PCR にかける。

ここでは、nested PCR を利用する場合について説明する。nested PCR とは、一組のプライマー対 (第一のプライマー対) で増幅される標的配列の内側に第二のプライマー対を設計し、一回目の PCR を行った後、その反応生成物を希釈して新たな鋳型として二回目の PCR を行うものである。一回目の PCR では標的配列の他に、望まれない配列も増幅されることがある。しかし、一回目の PCR で増幅された望まれない断片中に第二のプライマー対の各プライマーがアニールする配列が存在する確率は極めて低い。従って、このような 2 回の PCR を行うことにより、標的配列だけが選択的に増幅されるのである。

まず、鑑別すべきサブタイプ（例えば、サブタイプA、サブタイプB、サブタイプE）にそれぞれ特異的なプライマー対を用いて一回目のPCR（第一のPCR）を行う。あるいは、サブタイプに特異的なプライマー対の代わりに、どのサブタイプでも増幅することができる共通なプライマー対を用いてもよい。

サブタイプ特異的なプライマー対としては、例えば、HIV-1のenv遺伝子のC2領域の一部のヌクレオチド配列に相補的な配列を含むプライマー（プライマー4'）とHIV-1のenv遺伝子のC3領域の一部のサブタイプによって異なる（すなわち、サブタイプ特異的である）ヌクレオチド配列に相補的な配列を含むプライマー（プライマー3'）とからなるプライマー対を挙げることができる。HIV-1のenv遺伝子のC2領域は図1のようにサブタイプによりヌクレオチド配列が異なるので、この領域からヌクレオチド配列を選択して、プライマー4'を設計するとよい。また、HIV-1のenv遺伝子のC3領域は図2のようにサブタイプによる違いがあるので、この領域からヌクレオチド配列を選択して、プライマー3'を設計するとよい。一般に、プライマーの長さは、18~30塩基対であるとよく、好ましくは20~25塩基対である。具体的には、以下のプライマー対を用いることができる。

サブタイプAの検出のための第一のPCR用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 9AE/12A

プライマー9AE : CACAGTACAATGCACACATG (配列番号8)

プライマー12A : GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号5)

プライマー9AEは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、6943-6962番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプA、E、FおよびHに特異的なプライマーである。

プライマー12Aは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、7369-7350番目の配列に相補的な配列であり、サブタイ

プA、C、E、G、H、IおよびJに特異的なプライマーである。

サブタイプBの検出のための第一のPCR用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 9B/12B

プライマー9B : CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9)

プライマー12B : ACAGTAGAAAAATTCCCCTC (配列番号 6)

プライマー9Bは、HIV-1 (NL4-3 株)の全塩基配列の5'末端 (左端)から数えて、6943-6962 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプB、C、D、E、F、G、HおよびJに特異的なプライマーである。

プライマー12Bは、HIV-1 (NL4-3 株)の全塩基配列の5'末端 (左端)から数えて、7369-7350 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプB、D、E、FおよびIに特異的なプライマーである。

サブタイプEの検出のための第一のPCR用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 9AE/12E

プライマー9AE : CACAGTACAATGCACACATG (配列番号 8)

プライマー12E : GCAATAGAAAAATTCCCCTC (配列番号 7)

プライマー12Eは、HIV-1 (NL4-3 株)の全塩基配列の5'末端 (左端)から数えて、6943-6962 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプEにのみ特異的なプライマーである。

サブタイプCの検出のための第一のPCR用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 9B/12A

プライマー9B : CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9)

プライマー12A : GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号 5)

サブタイプDの検出のための第一のPCR用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 9B/12B

プライマー9B : CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9)

プライマー12B : ACAGTAGAAAAATTCCCCTC (配列番号 6)

サブタイプ F の検出のための第一の P C R 用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 9B/12A

プライマー9B : CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9)

プライマー12A : GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号 5)

サブタイプ G の検出のための第一の P C R 用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 9B/12A

プライマー9B : CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9)

プライマー12A : GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号 5)

サブタイプ H の検出のための第一の P C R 用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 9B/12A

プライマー9B : CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9)

プライマー12A : GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号 5)

あるいは、いくつかのサブタイプについて増幅産物を与えることができるプライマーの混合物をプライマーに用いて、第一の P C R を行ってもよい。この目的のためのプライマーとしては、プライマー9AE、プライマー9B、プライマー12A およびプライマー12B の混合物を挙げることができる。

この P C R 産物の 1/1000~1/5 量 (例えば、1 / 5 0 量) を用いて各サブタイプに特異的なもう一組のプライマー対を用いて二回目の P C R (第二の P C R) を行う。この時、第一の P C R で増幅される標的配列の内側に第二の P C R 用のプライマー対を設計する。例えば、第二の P C R 用のサブタイプに特異的なプライマー対を構成する少なくとも一方のプライマーは、H I V - 1 の env 遺伝子の C2 領域の一部のサブタイプ特異的なヌクレオチド配列に相補的な配列を含むプライマー (プライマー1) を挙げることができる。H I V - 1 の env 遺伝子の

C2 領域は図 1 のようにサブタイプによりヌクレオチド配列に相違があるので、この領域からヌクレオチド配列を選択して、プライマーを設計するとよい。H I V - 1 の種々のサブタイプの env 遺伝子の V3 領域の 3' 隣接領域 (C3 領域) のヌクレオチド配列を図 2 に示すが、サブタイプによりヌクレオチド配列に相違があるので適当な配列を選択して、プライマーを設計することができる。サブタイプ特異的プライマーの設計にあたっては、系統樹解析法を用い、あるサブタイプのヌクレオチド配列が他のサブタイプの対応するヌクレオチド配列と最も遺伝的距離が大きいものを選び出す。例えば、もう一方のプライマーとしては、H I V - 1 の env 遺伝子の C3 領域の一部のヌクレオチド配列に相補的な配列を含むプライマー (プライマー 2) を挙げることができる。具体的には、以下のヌクレオチド配列を含むプライマー対を用いることができる。

サブタイプ A の検出のための第二の P C R 用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 10/11QA

プライマー 10 : AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号 4)

プライマー 11QA : CTCCTGAGGGGTTAGCAAAG (配列番号 1)

プライマー 10 は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、6997-7016 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプ A、B、D および E に特異的なプライマーである。

プライマー 11QA は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、7313-7294 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプ A にのみ特異的なプライマーである。

・ 10U/11QA1

プライマー 10U : CTGTTAAATGGCAGTCTAGC (配列番号 20)

プライマー 11QA1 : CTCCTGAGGAGTTAGCAAAG (配列番号 27)

プライマー 10U は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、6992-7011 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイ

プA、B、D、EおよびJに特異的なプライマーである。

プライマー11QA1は、HIV-1 (NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、7313-7294番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプAにのみ特異的なプライマーである。

サブタイプBの検出のための第二のPCR用プライマー対とそのヌクレオチド配列

• 10/11BB

プライマー10 : AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号4)

プライマー11BB: CTGTGCATTACAATTTCTGG (配列番号2)

プライマー11BBは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、7338-7319番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプBにのみ特異的なプライマーである。

• 10U/11VB

プライマー10U: CTGTTAAATGGCAGTCTAGC (配列番号20)

プライマー11VB: CACAATTA¹AAACTGTGCATTAC (配列番号28)

プライマー11VBは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、7349-7328番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプBにのみ特異的なプライマーである。

サブタイプEの検出のための第二のPCR用プライマー対とそのヌクレオチド配列

• 10/11QE

プライマー10: AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号4)

プライマー11QE: CTCCTGAGGGTGGTTGAAAG (配列番号3)

プライマー11QE は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、7313-7294 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプ E にのみ特異的なプライマーである。

• 10U/11WE

プライマー10U: CTGTTAAATGGCAGTCTAGC (配列番号20)

プライマー11WE: CTCTACAATTAAAATGATGCATTG (配列番号30)

プライマー11WEは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、7352-7339番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプEにのみ特異的なプライマーである。

サブタイプCの検出のための第二のPCR用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・10C/11RC

プライマー10C : AAATGGTAGCCTAGCAGAAG (配列番号10)

プライマー11RC : CTCCTGAGGATGGTGCAAATTT (配列番号13)

プライマー10Cは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、6997-7016番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプCおよびFに特異的なプライマーである。

プライマー11RCは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、7313-7292番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプCにのみ特異的なプライマーである。

・10U/11XC

プライマー10U : CTGTAAATGGCAGTCTAGC (配列番号20)

プライマー11XC : TTGTTTTATTAGGGAAGTGTTT (配列番号29)

プライマー11XCは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、7289-7268番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプCに特異的なプライマーである。

サブタイプDの検出のための第二のPCR用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・10/11RD

プライマー10 : AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号4)

プライマー11RD : CTCCTGAGGATGGTTTAAAAAT (配列番号14)

プライマー11RDは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、7313-7292番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプDにのみ特異的なプライマーである。

サブタイプFの検出のための第二のPCR用プライマー対とそのヌ

クレオチド配列

・ 10C/11RF

プライマー10C : AAATGGTAGCCTAGCAGAAG (配列番号 1 0)

プライマー11RF : CTCCTGAGGATGAGTTAAATT (配列番号 1 5)

プライマー11RF は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、7313-7292 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプ F にのみ特異的なプライマーである。

サブタイプ G の検出のための第二の PCR 用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 10G/11SG

プライマー10G : GAATGGCAGTTTAGCAGAAG (配列番号 1 1)

プライマー11SG : TCCTGCAGATGAGTTAAAGG (配列番号 1 6)

プライマー10G は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、6997-7016 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプ G にのみ特異的なプライマーである。

プライマー11SG は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、7312-7293 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプ G にのみ特異的なプライマーである。

サブタイプ H の検出のための第二の PCR 用プライマー対とそのヌクレオチド配列

・ 10H/11SH

プライマー10H : GTCAAATGGCAGTTTAGCAG (配列番号 1 2)

プライマー11SH : TCCTGAGGATGGTTTAAAGG (配列番号 1 7)

プライマー10H は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、6994-7013 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプ H にのみ特異的なプライマーである。

プライマー11SH は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、7312-7293 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプ H にのみ特異的なプライマーである。

あるいは、どのサブタイプでも増幅できるようにするために、いくつかのサブタイプについて増幅産物を与えることができるプライマーの混合物を用いて、第二のPCRを行ってもよい。この目的のためのプライマーとしては、以下のプライマーの混合物を挙げることができる。

プライマー10U : AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号4)

プライマー11LB : AATTTCTGGGTCCCCTCCTG (配列番号18)

プライマー11LAE : AATTTCTAGATCCCCTCCTG (配列番号25)

プライマー11LC : AATTTCTAGGTCCCCTCCTG (配列番号26)

プライマー11LBは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左側)から数えて、7327-7308番目の配列に相補的であり、サブタイプB、D、F、GおよびIに特異的なプライマーである。

プライマー11LAEは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左側)から数えて、7327-7308番目の配列に相補的であり、サブタイプA、E、F、G、IおよびJに特異的なプライマーである。

プライマー11LCは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左側)から数えて、7327-7308番目の配列に相補的であり、サブタイプC、F、G、H、IおよびJに特異的なプライマーである。

その他に、以下のようなプライマーを利用することができる。

プライマー10KC : CTCAACTACTGTAAATGGTAG (配列番号21)

プライマー10KCは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、6984-7005番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプCにのみ特異的なプライマーである。

プライマー10UF : CTGTAAATGGCAGCCTAGC (配列番号22)

プライマー10UFは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)から数えて、6992-7011番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプA、E、F、HおよびIに特異的なプライマーである。

プライマー10UG : CTGTAAATGGCAGTTTAGC (配列番号23)

プライマー10UGは、HIV-1(NL4-3株)の全塩基配列の5'末端(左端)

から数えて、6992-7011 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプA、E、G、I およびJに特異的なプライマーである。

プライマー10UC : CTGTTAAATGGTAGTCTAGC (配列番号 2 4)

プライマー10UC は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、6992-7011 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプCおよびEに特異的なプライマーである。

プライマー11LE : AATTTCTAGATCTCCTCCTG (配列番号 1 9)

プライマー11LE は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左側) から数えて、7327-7308 番目の配列に相補的であり、サブタイプE、F、G、HおよびJに特異的なプライマーである。

プライマー11LC : AATTTCTAGGTCCCCTCCTG (配列番号 2 6)

プライマー11LC は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、7327-7308 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプC、F、G、H、I およびJに特異的なプライマーである。

プライマー11TC : TTCTCCTCTACAATTAAAGC (配列番号 3 1)

プライマー11TC は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、7357-7338 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプCにのみ特異的なプライマーである。

プライマー11RC1 : TTATTGTTTTATTAGGGAAGTG (配列番号 3 2)

プライマー11RC1 は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、7292-7271 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプCにのみ特異的なプライマーである。

プライマー11SE : TGCATTGTAATTTCTAGATCTC (配列番号 3 3)

プライマー11SE は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、7333-7314 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプEにのみ特異的なプライマーである。

プライマー11BE : TGATGCATTGTAATTTCTAG (配列番号 3 4)

プライマー11BE は、HIV-1 (NL4-3 株) の全塩基配列の 5' 末端 (左端) から数えて、7338-7319 番目の配列に相補的な配列であり、サブタイプ

プEにのみ特異的なプライマーである。

P C Rの手順および反応条件は、Bruisten S. et al., AIDS Res Hum Retroviruses 1993, 9:259-265に従えばよいが、ホットスタート法を行うことが望ましい。ホットスタート法とは、P C R反応液がホットプレートに置かれて、温度が高温（通常 90℃以上）になって初めて働き始めるP C R法をいう。

ところで、上記のような方法でH I V - 1のサブタイプ決定を行った際に、どのサブタイプも検出されないことがある。その原因として、H I V - 1 DNA濃度が検出限界以下であったか、あるいはプライマー結合部分に多数の変異が存在していた可能性が考えられる。

前者の可能性に対しては、一般に、H I V - 1は細胞中よりも血漿中の方が濃度が高いので、血漿からRNAを抽出し、逆転写酵素を用いてc DNAに変換してから上記の方法を行う。

後者の可能性に対しては、本法によるサブタイプ判定は保留とし、H I V - 1の他の遺伝子領域をP C Rで増幅してヌクレオチド配列を決定し、従来の方法でサブタイプを決定する。（注：感染の有無は抗体検査によって行う。本法はH I V - 1感染を判定するものではない。）

P C Rの反応生成物をアガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロミド染色で検出する。試料DNA中のH I V - 1のサブタイプに一致したプライマーを用いたときは明瞭なバンドが観測されるが、一致しないときは微かなバンドが観測されるかあるいは全くバンドが観測されない。これによってH I V - 1のサブタイプを決定する。

本発明のH I V - 1のサブタイプ決定法は、さらに、H I V - 1のゲノムのヌクレオチド配列の一部であって、ヌクレオチド配列がすべてのサブタイプの間で高度に保存されている一部を標的配列とする核酸の増幅反応を行い、核酸の増幅の有無によりH I V - 1の存在または不存在を確認する工程を含んでもよい。H I V - 1の存在または不存在を確認する工程は、第一のP C R用のプライマーの混合物（例えば、9 AE/9B/12A/12B）を用いて、H I V - 1のゲノムのヌクレオチド

配列の一部であって、ヌクレオチド配列がすべてのサブタイプの間で高度に保存されている一部を標的配列とする核酸の増幅反応を行った後、第二のPCR用のプライマーの混合物（例えば、10U/11LB/11LAE/11LC）を用いて、前記標的配列の内部のヌクレオチド配列を標的配列とする第二の増幅反応を行い、核酸の増幅の有無によりHIV-1の存在または不存在を確認することからなるとよい。

本発明は、HIV-1のenv遺伝子のヌクレオチド配列の一部であって、5'末端部および3'末端部のうちの少なくとも片方のヌクレオチド配列がサブタイプにより異なる一部を標的配列とするプライマー対を含む、HIV-1のサブタイプを決定するためのキットも包含する。プライマー対としては、上述したような、第二のPCR用のプライマー対(inner primers)、あるいは第一のPCR用のプライマー対(outer primers)と第二のPCR用のプライマー対との組み合わせを挙げることができる。本発明のキットは、その他にも、dNTP混合物、反応用バッファー、DNAポリメラーゼ、第一のPCR用のサブタイプ共通プライマー対（例えば、9B/12B）、第二のPCR用のサブタイプ共通プライマー対（例えば、10U/11VB）などを含むとよい。また、プライマーと検体HIV-1 DNAの塩基対の不一致による影響を減じるために、反応バッファー中のマグネシウムイオン濃度を通常の1.5 mMを4 mM程度まで高めることが望ましい。

この診断キットにおいて、キットを構成する要素は、各々あるいは組み合わせてあるいはひとまとめにして、バイアル、チューブなどのような容器に包含されていてもよく、さらに、それらの容器はひとまとめにして納めるための区画化された担持手段に納められていてもよい。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに何ら限定されることはない。

〔実施例1〕

対象と方法

1) サブタイプ決定法の検討のためのサブタイプ別標準検体

env 遺伝子のシーケンシングと系統樹解析により、サブタイプAと決定されたH I V感染者3名、サブタイプBと決定されたH I V感染者8名、およびサブタイプEと決定されたH I V感染者3名の血液より、DNAを抽出し、これを標準検体として用いた。

2) サブタイプを決定した対象

東京都内の病院に通院または入院している8名のH I V感染者を対象としてH I V-1のサブタイプを決定した。

3) H I V患者の血液からのDNAの調製

上記のH I V感染者から、10 ml の末梢血を採取した。抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いた。末梢血から Ficoll-Paque (Pharmacia 社) 密度勾配遠心によって単核球を分離した後、QIAamp Blood Kit (QIAGEN 社) を用いてDNAを調製した。DNAは純水あるいは1mMEDTAを含むバッファーに溶解し、使用直前まで-20℃で保存した。このDNAの0.5 μ gを用いて、PCRを行った。

4) PCRによるサブタイプA、BおよびEの検出

PCRに使用したプライマーのヌクレオチド配列を図3に示す。

サブタイプAの特異的検出のために、一回目のPCR用のプライマーとして、9AEと12Aを用い、二回目のPCR用のプライマーとして、10と11QAを用いて、nested PCRを行った。サブタイプBの特異的検出のためには、一回目のPCR用のプライマーとして、9Bと12Bを用い、二回目のPCR用のプライマーとして、10と11BBを用いて、nested PCRを行った。サブタイプEの特異的検出のためには、一回目のPCR用のプライマーとして、9AEと12Eを用い、二回目のPCR用のプライマーとして、10と11QEを用いて、nested PCRを行った(図3)。

PCRは、H I V感染者から調製したDNAのうちの0.5 μ gを試料として用い、100 μ Lの反応液(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 1.0 μ Mのプライマー, 2.5単位のTaq

polymerase) で、94℃ 15秒、56℃ 30秒、72℃ 1分のサイクルを30回行った。二回目のPCRは、一回目のPCRの反応液2 μ Lを試料として用い、同じ条件で25サイクル行った。ただし、56℃ 30秒の代わりに60℃ 30秒とした。

PCR産物（サブタイプAとEは317 bp、サブタイプBは342 bp）の検出は、2%アガロースゲルの電気泳動による分離後、エチジウムブロミド染色を行うことにより行った。

結果

1) サブタイプ別標準検体のPCRによるサブタイプ決定の検討

ウイルスゲノムのシーケンシングによってサブタイプが決定されている検体については、以下のような結果となった。サブタイプA検出用プライマーを用いたPCRではサブタイプAの検体のみ陽性で、サブタイプBおよびEの検体はすべて陰性であった。また、サブタイプB検出用プライマーを用いたPCRではサブタイプBの検体のみ陽性で、サブタイプAおよびEの検体はすべて陰性であった。また、サブタイプE検出用プライマーを用いたPCRではサブタイプEの検体のみ陽性で、サブタイプAおよびBの検体はすべて陰性であった（図4）。

2) PCRによるHIV感染者のサブタイプ決定

東京都内の病院に通院または入院している8名のHIV感染者についてHIV-1のサブタイプを決定した結果を表1に示す。

表1. サブタイプ未知の8検体に対するサブタイプ決定法の結果

症例	サブタイプA用 プライマー対	サブタイプB用 プライマー対	サブタイプE用 プライマー対
P18	-	+	-
P19	-	+	-
P20	-	+	-
P21	-	-	+
P22	-	?	-
P23	-	-	+
P24	-	+	-
P25	-	+	-

＋はHIV-1特異的DNAバンドが検出されたことを示し、－は検出されなかったことを示す。症例22の？は、予想より短いバンドが検出されたことを示す。

この結果から、症例 P18、P19、P20、P24、P25 はサブタイプ B に感染し、症例 P21 と P23 はサブタイプ E に感染していると診断される。症例 P22 では、サブタイプ B 用のプライマー対を用いたときのみ DNA バンドが検出されたが、その長さが予想よりも短かったので判定保留とした。以上の診断結果が正しいことを確認するために、増幅された DNA をシーケンシングし、系統樹解析を行ったが、その結果は表 1 の結果と一致していた。判定保留の症例 P22 はサブタイプ B であった。

1) と 2) の結果を合わせると、本法は 22 症例中 21 症例のサブタイプを正しく診断できた。残りの 1 症例は判定保留であった。すなわち、本法は簡便で正確なサブタイプ決定法であることが実証された。

本発明の方法によれば、1 検体あたり約 2,000 円程度の費用で、HIV-1 のサブタイプを決定することができる。また、サブタイプ決定に必要な時間は、8 検体を一度に扱うとして、DNA 分離に 2 時間、PCR に 6 時間、電気泳動に 1 時間程度である。

〔実施例 2〕

対象と方法

1) サブタイプ決定法の検定のためのサブタイプ別標準検体

実施例 2 で対象とした、サブタイプ A の HIV-1 の感染者 3 名、サブタイプ B の HIV-1 の感染者 3 名、およびサブタイプ E の HIV-1 の感染者 3 名に、env 遺伝子のシーケンシングと系統樹解析によりサブタイプ C と決定された HIV-1 の感染者 2 名を加えた合計 11 名の血液より DNA を抽出し、これを標準検体として用いた。

2) サブタイプを決定した対象

東京都内の病院に通院または入院している 32 名の HIV 感染者を対象として HIV-1 のサブタイプを決定した。

3) HIV 患者の血液からの DNA の調製

上記の HIV 感染者から、10 ml の末梢血を採取した。抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いた。末梢血から Ficoll-Paque

(Pharmacia 社) 密度勾配遠心によって単核球を分離した後、QIAamp Blood Kit (QIAGEN 社) を用いてDNAを調製した。DNAは純水あるいは1 mM EDTA を含むバッファーに溶解し、使用直前まで-20℃で保存した。このDNAの0.5 μ gを用いて、PCRを行った。

4) PCRによるサブタイプA, B, CおよびEの検出

PCRに使用したプライマーのヌクレオチド配列を図5に示す。

一回目のPCR用のプライマーとして、9AE、9B、12A および 12B の混合物を用いた。二回目のPCR用のプライマーとして、サブタイプAの特異的検出のためには10Uと11QA1を用い、サブタイプBの特異的検出のためには10Uと11VBを用い、サブタイプCの特異的検出のためには10Uと11XCを用い、サブタイプEの特異的検出のためには10Uと11WEを用いてnested PCRを行った。サブタイプに関係なくHIV-1のDNAを増幅するためには、10U、11LB、11LAE および 11LC の混合物を用いてnested PCRを行った(図5)。

PCRは、HIV感染者から調製したDNAのうちの0.5 μ gを試料として用い、100 μ Lの反応液(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 1.0 μ M プライマー, 2.5 単位の Taq polymerase)で、94℃15秒、56℃30秒、72℃1分のサイクルを30回行った。二回目のPCRは、一回目のPCRの反応液2 μ Lを試料として用い、同じ条件で25サイクル行った。ただし、56℃30秒の代わりに60℃30秒とした。

PCR産物(サブタイプAは322 bp、サブタイプBは358 bp、サブタイプCは298 bp、サブタイプEは361 bp)の検出は、2%アガロースゲルの電気泳動による分離後、エチジウムブロミド染色を行うことにより行った。

結果

1) サブタイプ別標準検体のPCRによるサブタイプの検討

ウイルスゲノムのシーケンシングによってサブタイプが決定されている検体については、以下のような結果となった。サブタイプA検出

用のプライマーを用いたPCRではサブタイプAの検体のみ陽性で、サブタイプB、CおよびEの検体はすべて陰性であった。また、サブタイプB検出用のプライマーを用いたPCRではサブタイプBの検体のみ陽性で、サブタイプA、CおよびEの検体はすべて陰性であった。また、サブタイプC検出用のプライマーを用いたPCRではサブタイプCの検体のみ陽性で、サブタイプA、BおよびEの検体はすべて陰性であった。また、サブタイプE検出用のプライマーを用いたPCRではサブタイプEの検体のみ陽性で、サブタイプA、BおよびCの検体はすべて陰性であった(図6)。また、サブタイプに関係なくHIV-1のDNAを増幅するためのプライマーを用いたPCRではすべての検体が陽性であった(図6)。

2) PCRによるHIV感染者のサブタイプ決定。

東京都内の病院に通院または入院している32名のHIV感染者を対象としてHIV-1のサブタイプを決定した。内訳は、11例のサブタイプ別標準検体を合わせると、サブタイプAが3例、サブタイプBが30例、サブタイプCが2例、サブタイプEが8例であった。

以上の診断結果が正しいことを確認するために、PCRによってサブタイプが決定されたHIV感染者合計43名のうちの21名について、増幅されたDNAをシーケンシングし、系統樹解析を行った結果を図7に示す。その結果、これらのHIV-1について、PCRによって決定されたサブタイプと系統樹分析によって決定されたサブタイプは完全に一致していた。

実施例2が実施例1と方法において大きく異なる点は、一回目のPCRではプライマーを共通にし、二回目のPCRでサブタイプ特異的プライマーを用いたことである。その結果、PCRの反応数を8分の5に軽減することができた。実施例1では判定保留例が1例あったことを考え合わせると、実施例2の方法によって、診断がより正確になるとともに、一層簡便なものにすることができた。

3) 遺伝型による薬剤耐性検査に与えるサブタイプの影響

遺伝型による薬剤耐性検査はサブタイプBのデータをもとに行われている。サブタイプB以外のH I V - 1の薬剤耐性をサブタイプBのデータで判定できるかどうかを調べるために、サブタイプB以外のH I V - 1に感染し、H A A R T療法を受けている4名の感染者について、H A A R T療法開始前後におけるH I V - 1のプロテアーゼのアミノ酸配列を決定した。図8にはプロテアーゼ阻害剤に対する耐性と関係があるアミノ酸のみを示す。サブタイプEに感染した症例C3の場合、H A A R T療法開始後、アミノ酸番号10がL（ロイシン）からF（フェニルアラニン）に、またアミノ酸番号20がK（リシン）がT（スレオニン）に変異している。これらはサブタイプBにおいて薬剤耐性を示すアミノ酸変異として認められている。しかし、4名の患者すべてで、アミノ酸番号36がH A A R T療法開始前からI（イソロイシン）となっている。サブタイプBのデータでは、アミノ酸番号36がIのH I V - 1は薬剤耐性であると判定される。しかし、H I V - 1が薬剤投与前から薬剤耐性を獲得していたとは考えにくい。したがって、この変異はサブタイプB以外のH I V - 1では薬剤耐性とは関係ないと考えた方が自然である。この結果から、遺伝型によって薬剤耐性を正しく判定するためには、サブタイプを事前に診断することが重要であると考えられる。

4) サブタイプと性行動の関係

面接によって性的嗜好が推定できたH I V感染者22名について、サブタイプと性的行動との関係を図9にまとめた。Heterosexualとは異性愛者、MSMとは男性同性愛者のことである。異性愛者ではサブタイプBとEが同数であるのに対して、男性同性愛者ではサブタイプBが圧倒的に多い。これは、東南アジア由来のH I Vが異性愛者の中に浸透しているが、男性同性愛者の中にはあまり浸透していないことを示唆していると考えられる。

〔実施例3〕

対象と方法

1) ウェスタンブロット法陰性、P A法陽性の血清検体

東京都内の病院における血液検査で、ウェスタンブロット法ではH I V - 1 陰性であったが、P A法ではH I V - 1 陽性であった15件の血清検体を対象とした。

2) 血漿からのRNAからのDNAの調製

上記の血清検体 200 μ L から RNAeasy Kit (QIAGEN 社) を用いて RNA を調製した。RNA は純水に溶解し、使用直前まで -20℃ で保存した。

3) P C R による H I V - 1 の検出

血清 20 μ L 分に相当する RNA を試料とし、プライマー 12A と 12B の混合物を用い、20 μ L の反応液 (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 5 μ M プライマー, 100 単位の逆転写酵素) で、42℃ 30 分反応させ cDNA を合成した。この cDNA を試料とし、サブタイプに関係なく H I V - 1 の DNA を増幅できる nested PCR を行った。一回目の P C R 用のプライマーとして、9AE、9B、12A および 12B の混合物を用いた。二回目の P C R 用のプライマーとして、10U、11LB、11LAE および 11LC の混合物を用いた。

一回目の P C R は、100 μ L の反応液 (10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1.0 μ M プライマー, 2.5 単位の Taq polymerase) で、94℃ 15 秒、56℃ 30 秒、72℃ 1 分のサイクルを 30 回行った。二回目の P C R は、一回目の P C R の反応液 2 μ L を試料として用い、同じ条件で 25 サイクル行った。ただし、56℃ 30 秒の代わりに 60℃ 30 秒とした。

P C R 産物 (サブタイプ A は 322 bp、サブタイプ B は 358 bp、サブタイプ C は 298 bp、サブタイプ E は 361 bp) の検出は、2% アガロースゲルの電気泳動による分離後、エチジウムブロミド染色を行うことにより行った。

結果

ウェスタンブロット法では H I V - 1 陰性であるが、P A法では H

I V - 1 陽性であった 15 件の血清検体いずれからも P C R によって H I V - 1 が検出されなかった (図 10)。今回用いた P C R はすべてのサブタイプの H I V - 1 が検出できるように設計されたもので、少なくとも、サブタイプ A、B、C および E の H I V - 1 は検出できることが実証されている (図 6)。したがって、今回検査した血清検体のウェスタンブロット法と P A 法の結果が一致しなかったのは、サブタイプの問題ではなく、P A 法による擬陽性の結果である可能性が高いと考えられる。

このように、サブタイプに関係なく H I V - 1 が検出できる P C R は、H I V - 1 感染の確定診断として有効であると考えられる。

本発明により、H I V - 1 のサブタイプを決定する簡便な方法が提供された。

また、H I V - 1 のサブタイプを決定するのに有効な手段も提供された。

配列番号 1 は、プライマー 11QA のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 2 は、プライマー 11BB のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 3 は、プライマー 11QE のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 4 は、プライマー 10 のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 5 は、プライマー 12A のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 6 は、プライマー 12B のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 7 は、プライマー 12E のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 8 は、プライマー 9AE のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 9 は、プライマー 9B のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 10 は、プライマー 10C のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 11 は、プライマー 10G のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 12 は、プライマー 10H のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 13 は、プライマー 11RC のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 14 は、プライマー 11RD のヌクレオチド配列を示す。

配列番号 15 は、プライマー 11RF のヌクレオチド配列を示す。

- 配列番号 16 は、プライマー 11SG のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 17 は、プライマー 11SH のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 18 は、プライマー 11LB のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 19 は、プライマー 11LE のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 20 は、プライマー 10U のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 21 は、プライマー 10KC のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 22 は、プライマー 10UF のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 23 は、プライマー 10UG のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 24 は、プライマー 10UC のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 25 は、プライマー 11LAE のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 26 は、プライマー 11LC のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 27 は、プライマー 11QA1 のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 28 は、プライマー 11VB のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 29 は、プライマー 11XC のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 30 は、プライマー 11WE のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 31 は、プライマー 11TC のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 32 は、プライマー 11RC1 のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 33 は、プライマー 11SE のヌクレオチド配列を示す。
配列番号 34 は、プライマー 11BE のヌクレオチド配列を示す。

請求の範囲

1. HIV-1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列の一部であって、5' 末端部および 3' 末端部のうちの少なくとも片方のヌクレオチド配列が HIV-1 のサブタイプにより異なる一部を標的配列として核酸の増幅反応を行い、核酸の増幅の有無によりサブタイプの検出を行うことを特徴とする、HIV-1 のサブタイプを決定する方法。
2. 標的配列が 100 ～ 2500 ヌクレオチドの長さである請求項 1 記載の方法。
3. 標的配列の 3' 末端および／または 5' 末端から 1 番目～30 番目の塩基までの配列がサブタイプによって異なる請求項 1 に記載の方法。
4. 標的配列の 3' 末端が HIV-1 の env 遺伝子の C3 領域にある請求項 3 記載の方法。
5. 標的配列の 5' 末端が HIV-1 の env 遺伝子の C2 領域にある請求項 4 記載の方法。
6. 異なるプライマー対を用いる異なる増幅反応を行い、異なるサブタイプの検出を行う請求項 1 に記載の方法。
7. HIV-1 の env 遺伝子の C3 領域の一部のサブタイプによって異なるヌクレオチド配列（ヌクレオチド配列 1）に相補的な配列を含むプライマー（プライマー 1）と HIV-1 の env 遺伝子の C2 領域の一部のヌクレオチド配列（ヌクレオチド配列 2）に相補的な配列を含むプライマー（プライマー 2）とからなるプライマー対を用いる増幅反応を少なくとも 2 回プライマー対を変えて行い、少なくとも 2 つのサブタイプの検出を行う請求項 6 記載の方法。
8. 第一のプライマー対を用いて、HIV-1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列の一部を標的配列とする第一の増幅反応を行った後、第二のプライマー対を用いて、前記標的配列の一部であって、5' 末端部および 3' 末端部のうちの少なくとも片方のヌクレオチド配列がサブタイプにより異なる一部を標的配列とする第二の増幅反応を行い、第二の増幅反応による核酸の増幅の有無によりサブタイプの検出を行う

請求項 1 に記載の方法。

9. 第二のプライマー対が、H I V - 1 の env 遺伝子の C3 領域の一部のサブタイプによって異なるヌクレオチド配列（ヌクレオチド配列 1）に相補的な配列を含むプライマー（プライマー 1）と H I V - 1 の env 遺伝子の C2 領域の一部のヌクレオチド配列（ヌクレオチド配列 2）に相補的な配列を含むプライマー（プライマー 2）とからなり、第一のプライマー対が、H I V - 1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列 1 の 3' 末端の下流の領域の一部のヌクレオチド配列（ヌクレオチド配列 3）に相補的な配列を含むプライマー（プライマー 3）と H I V - 1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列 2 の 5' 末端の上流の領域の一部のヌクレオチド配列（ヌクレオチド配列 4）に相補的な配列を含むプライマー（プライマー 4）とからなる請求項 8 記載の方法。

10. 第一のプライマー対を用いて H I V - 1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列の一部を標的配列とする第一の増幅反応を行った後、第二のプライマー対を用いて前記標的配列の内部のヌクレオチド配列を標的配列とする第二の増幅反応を行い、第二の増幅反応による核酸の増幅の有無によりサブタイプの検出を行う一連の操作を第二のプライマー対を変えて少なくとも 1 回繰り返すことにより、少なくとも 2 つのサブタイプの鑑別を行う請求項 8 に記載の方法。

11. (a) 第一のプライマー対として、GCAATAGAAAAATTCTCCTC（配列番号 5）のヌクレオチド配列を含むプライマー 12A および ACAGTAGAAAAATTCCCCTC（配列番号 6）のヌクレオチド配列を含むプライマー 12B の混合物と、CACAGTACAATGCACACATG（配列番号 8）のヌクレオチド配列を含むプライマー 9AE および CACAGTACAATGTACACATG（配列番号 9）のヌクレオチド配列を含むプライマー 9B の混合物を用い、第二のプライマー対として、CTCCTGAGGAGTTAGCAAAG（配列番号 27）のヌクレオチド配列を含むプライマー 11QA1 および CTGTTAAATGGCAGTCTAGC（配列番号 20）のヌクレオチド配列を含むプライマー 10U を用いサブタイプ A の検出を行い、

(b) 第一のプライマー対として、GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号 5) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12A および ACAGTAGAAAAATTCCCCTC (配列番号 6) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12B の混合物と、CACAGTACAATGCACACATG (配列番号 8) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9AE および CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9B の混合物を用い、第二のプライマー対として、CACAATTAAAACTGTGCATTAC (配列番号 28) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11VB および CTGTTAAATGGCAGTCTAGC (配列番号 20) のヌクレオチド配列を含むプライマー 10U を用いサブタイプ B の検出を行い、

(c) 第一のプライマー対として、GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号 5) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12A および ACAGTAGAAAAATTCCCCTC (配列番号 6) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12B の混合物と、CACAGTACAATGCACACATG (配列番号 8) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9AE および CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9B の混合物を用い、第二のプライマー対として、TTGTTTTATTAGGGAAGTGTTT (配列番号 29) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11XC および CTGTTAAATGGTAGTCTAGC (配列番号 24) のヌクレオチド配列を含むプライマー 10UC を用いサブタイプ C の検出を行い、

(d) 第一のプライマー対として、GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号 5) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12A および ACAGTAGAAAAATTCCCCTC (配列番号 6) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12B の混合物と、CACAGTACAATGCACACATG (配列番号 8) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9AE および CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9B の混合物を用い、第二のプライマー対として、CTCTACAATTAAAATGATGCATTG (配列番号 30) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11WE および CTGTTAAATGGCAGTCTAGC (配列番号 20) のヌクレオチド配列を含むプ

ライマー10U を用いサブタイプEの検出を行うことにより、サブタイプA、B、CおよびEの鑑別を行う請求項10記載の方法。

12. 第一のプライマー対を用いてHIV-1のenv遺伝子のヌクレオチド配列の一部を標的配列とする第一の増幅反応を行った後、第二のプライマー対を用いて前記標的配列の内部のヌクレオチド配列を標的配列とする第二の増幅反応を行い、第二の増幅反応による核酸の増幅の有無によりサブタイプの検出を行う一連の操作を第一のプライマー対および第二のプライマー対を変えて少なくとも1回繰り返すことにより、少なくとも2つのサブタイプの鑑別を行う請求項8に記載の方法。

13. (a) 第一のプライマー対として、GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号5) のヌクレオチド配列を含むプライマー12A および CACAGTACAATGCACACATG (配列番号8) のヌクレオチド配列を含むプライマー9AE を用い、第二のプライマー対として、CTCCTGAGGGGTTAGCAAAG (配列番号1) のヌクレオチド配列を含むプライマー11QA および AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号4) のヌクレオチド配列を含むプライマー10 を用いてサブタイプAの検出を行い、

(b) 第一のプライマー対として、ACAGTAGAAAAATTCCCCTC (配列番号6) のヌクレオチド配列を含むプライマー12B および CACAGTACAATGTACACATG (配列番号9) のヌクレオチド配列を含むプライマー9B を用い、第二のプライマー対として、CTGTGCATTACAATTTCTGG (配列番号2) のヌクレオチド配列を含むプライマー11BB および AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号4) のヌクレオチド配列を含むプライマー10 を用いてサブタイプBの検出を行い、また、

(c) 第一のプライマー対として、GCAATAGAAAAATTCCCCTC (配列番号7) のヌクレオチド配列を含むプライマー12E および CACAGTACAATGCACACATG (配列番号8) のヌクレオチド配列を含むプライマー9AE を用い、第二のプライマー対として、CTCCTGAGGGTGTTGAAAG (配列番号3) のヌクレオチド配列を含むプライマー11QE および

AAATGGCAGTCTAGCAGAAG (配列番号 4) のヌクレオチド配列を含むプライマー 10 を用いてサブタイプ E の検出を行うことにより、サブタイプ A、B および E の鑑別を行う請求項 1 2 記載の方法。

1 4. さらに、H I V - 1 のゲノムのヌクレオチド配列の一部であって、ヌクレオチド配列がすべてのサブタイプの間で高度に保存されている一部を標的配列とする核酸の増幅反応を行い、核酸の増幅の有無により H I V - 1 の存在または不存在を確認する工程を含む請求項 1 に記載の方法。

1 5. H I V - 1 の存在または不存在を確認する工程が、第一のプライマー対を用いて、H I V - 1 のゲノムのヌクレオチド配列の一部であって、ヌクレオチド配列がすべてのサブタイプの間で高度に保存されている一部を標的配列とする核酸の増幅反応を行った後、第二のプライマー対を用いて、前記標的配列の内部のヌクレオチド配列を標的配列とする第二の増幅反応を行い、核酸の増幅の有無により H I V - 1 の存在または不存在を確認することからなる請求項 1 4 記載の方法。

1 6. ヌクレオチド配列が異なる複数の上流プライマーおよびヌクレオチド配列が異なる複数の下流プライマーの混合物をプライマーとして用いる請求項 1 5 記載の方法。

1 7. 第一のプライマーとして、GCAATAGAAAAATTCTCCTC (配列番号 5) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12A、ACAGTAGAAAAATTCCCCTC (配列番号 6) のヌクレオチド配列を含むプライマー 12B、CACAGTACAATGCACACATG (配列番号 8) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9AE および CACAGTACAATGTACACATG (配列番号 9) のヌクレオチド配列を含むプライマー 9B の混合物を用い、第二のプライマー対として、AATTTCTGGGTCCCCTCCTG (配列番号 1 8) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11LB、AATTTCTAGATCCCCTCCTG (配列番号 2 5) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11LAE、AATTTCTAGGTCCCCTCCTG (配列番号 2 6) のヌクレオチド配列を含むプライマー 11LC および

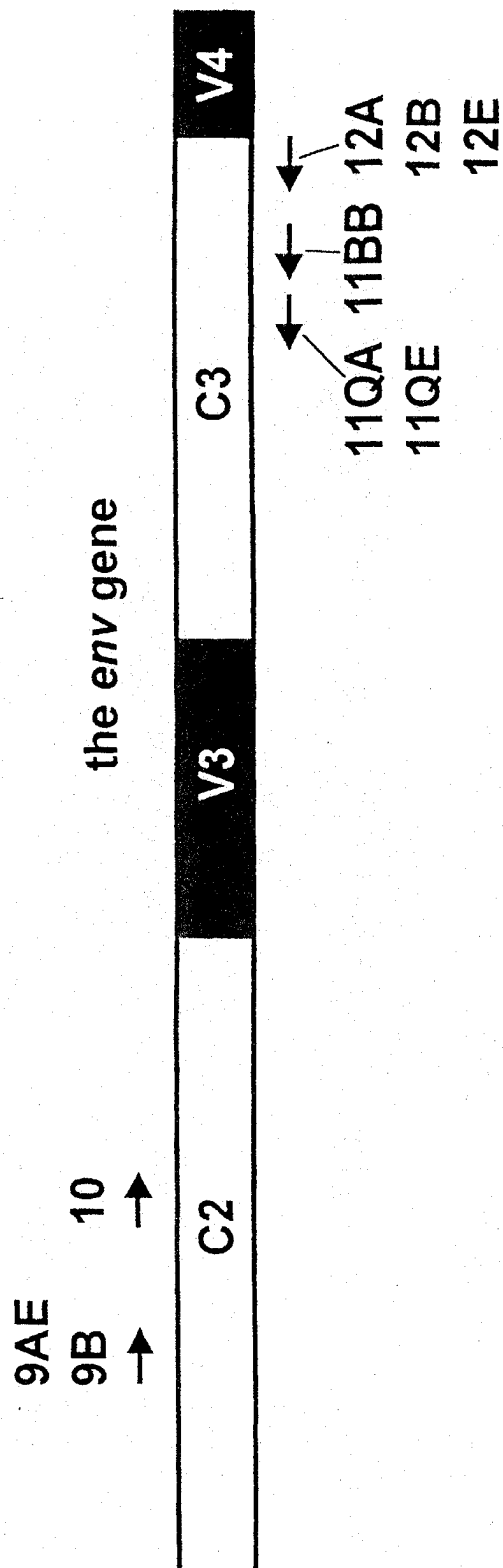
CTGTTAAATGGCAGTCTAGC (配列番号 20) のヌクレオチド配列を含むプライマー10Uの混合物を用いる請求項16記載の方法。

18. HIV-1 の env 遺伝子のヌクレオチド配列の一部であって、5'末端部および3'末端部のうちの少なくとも片方のヌクレオチド配列がサブタイプにより異なる一部を標的配列とするプライマー対を含む、HIV-1のサブタイプを決定するためのキット。

Fig. 1

サブタイプ A	TGTAataccTCAgccatTAcAcAgGcTtGtCCaAAggTatCCTTTGAgCCaATTCCCATA
サブタイプ B	-----c-----t-----c-----
サブタイプ C	-----A-----a-----C-----c-t-----c-----T-----
サブタイプ D	-----g-----a-----
サブタイプ E	-----T-----T-----aG-----a-----T-----t-----
サブタイプ F	-----A-----T-GG-----T-----
サブタイプ G	-----gt-----A-----A-----ga?T-----c-----
サブタイプ H	-----GT-----A-----GAGT-----T-----
サブタイプ A	caTTATTGtgCcCCaGCTGGtTttGCgATtCTAAagTGtAa?gataaggagTTcaatGGA
サブタイプ B	-----g-----t-----a-----
サブタイプ C	-----t-----a-----ta-----aca-----g
サブタイプ D	-----a-----a-----a-----A-----g
サブタイプ E	-----a-t-----a-----t-----T-----a-t-----g
サブタイプ F	-----T-----A-----T-----aA-----G
サブタイプ G	-----T-----t-----gg-----a-?-----
サブタイプ H	-----T-----G-----A-----GG-----A-----G
サブタイプ A	acAGGgccatGcaagAATGTcAGcaCaGTaCAATGcACacATGGaATcAagCCAGtagTa
サブタイプ B	-----a-----t-ca-----t-----t-g-----
サブタイプ C	-----a-----c-t-----t-----t-----g-----
サブタイプ D	-----?-----a-----t-----g-t-g-----g
サブタイプ E	-----t-A-----T-----T-----G-----
サブタイプ F	-----g-----T-----T-----T-A-----g-----
サブタイプ G	-----A-----T-a-----T-----T-----T-----g-----
サブタイプ H	-----G-AA-----T-A-----T-----T-----T-----G-----
サブタイプ A	tCAACTCAaCTgcTGtTaAATGGcAGtcTAGCAgaAgaa???gaggTAatgaTtagaTCT
サブタイプ B	-----g-a-----
サブタイプ C	-----a-----t-c-----a-----a-----
サブタイプ D	-----?-----g-----a-----A-----
サブタイプ E	-----t-----A-----A-c-----
サブタイプ F	-----T-T-----C-----ta-----A-c-----
サブタイプ G	-----t-a-c-g-----t-----aA-----a-----
サブタイプ H	-----T-A-C-GTCAAATG-CAGTTT-C-----?a-----a-----
サブタイプ A	gAaaataTcacAaAcAATgccaaaaAccaTAaTaGTacAgcTtg??aagcctGTAA?aATt
サブタイプ B	-----t-----gg-----t-----gaa-g-at-----ga-----
サブタイプ C	-----c-g-----t-----a-----t-----aAtg-at-----ga-----
サブタイプ D	-----c-----t-----?-----AATG-----t-----?c-----
サブタイプ E	-----C-----G-C-----AAT-At-----Ga-----C
サブタイプ F	c-----t-g-t-----A-----?-----AATg-At-----ca-----
サブタイプ G	-----c?-----g-----gt-----g-----AAt-a?-a-ga-----
サブタイプ H	-----c-----g-----a-----gt-----AAt-a?-g-----
サブタイプ A	aatTGT
サブタイプ B	-----
サブタイプ C	gtg---
サブタイプ D	-----
サブタイプ E	-----
サブタイプ F	-----
サブタイプ G	---?---
サブタイプ H	---?---

サブタイプ A	TGTAatgTcAgtaga?cagaaTGGaAtaaaacttTacaa?aggtagcta?acAatTAaga
サブタイプ B	-----ca-t-----g-a-----c-----a-c-a--t--A-----
サブタイプ C	-----cA-T-----a-ga?a-----?-a-----ag-a-a-----gc-
サブタイプ D	-----a-T-----a-ga?a-----c-----a-a-----g-
サブタイプ E	---G-gA-T-A-g--A--a-----g-g-----a-c-----a-ga-a-----a-
サブタイプ F	-----c--t--g--a--C-----?-?-g--a-----a?ggc-a-g-----ag
サブタイプ G	-----t-----a?-a-t-----?g-g-tG-----ga-t--?a??gc?-C--a-
サブタイプ H	-----T-----g?-a?-g-g-tg--?-?a-----?-c-----?a-
サブタイプ A	aaa.....tacTtt????????aacaaca...?????ataatcTTtgctaac...
サブタイプ B	g--?????c-a---...g-g-----t-----...-----g-----aa-c-a???
サブタイプ C	g--.....c---ccct-----T-----.....aa-----acca...
サブタイプ D	g-c?.....cTtc-----.....aca-----t---aaacCa...
サブタイプ E	g-g.....C-----...a-t--T-G-----.....caaCCA???
サブタイプ F	tct.....c-t--c---...-----tgc-----aa---aactcA...
サブタイプ G	g--.....at-----?c???-----c---aaCtCA...
サブタイプ H	---.....?-a---t---??.....c---aaacca???
サブタイプ A	?cctcaGGaGGGGAt?TaGAAaTtacAAcacAtAgttTTAaTTGTggAgGagaattttTtc
サブタイプ B	t-----cCc-----gt--tg--c-----g-----
サブタイプ C	t-----cc-----c-----a-----
サブタイプ D	t-----ccc-----c-----g-----
サブタイプ E	c-----a--C-----tg--ca-----A--g-----
サブタイプ F	t-----CC-----tg-----a-----
サブタイプ G	t-tg-----cC-----a-----
サブタイプ H	t-----Cc-----?-----a-----
サブタイプ A	TAtTGc
サブタイプ B	--c--t
サブタイプ C	-----
サブタイプ D	--C---
サブタイプ E	-----
サブタイプ F	--C---
サブタイプ G	-----t
サブタイプ H	-----t



3 / 1 0
F i g. 3

Primers used for	
Subtype	1st PCR 2nd PCR
A	9AE/12A 10/11QA
B	9B/12B 10/11BB
E	9AE/12E 10/11QE

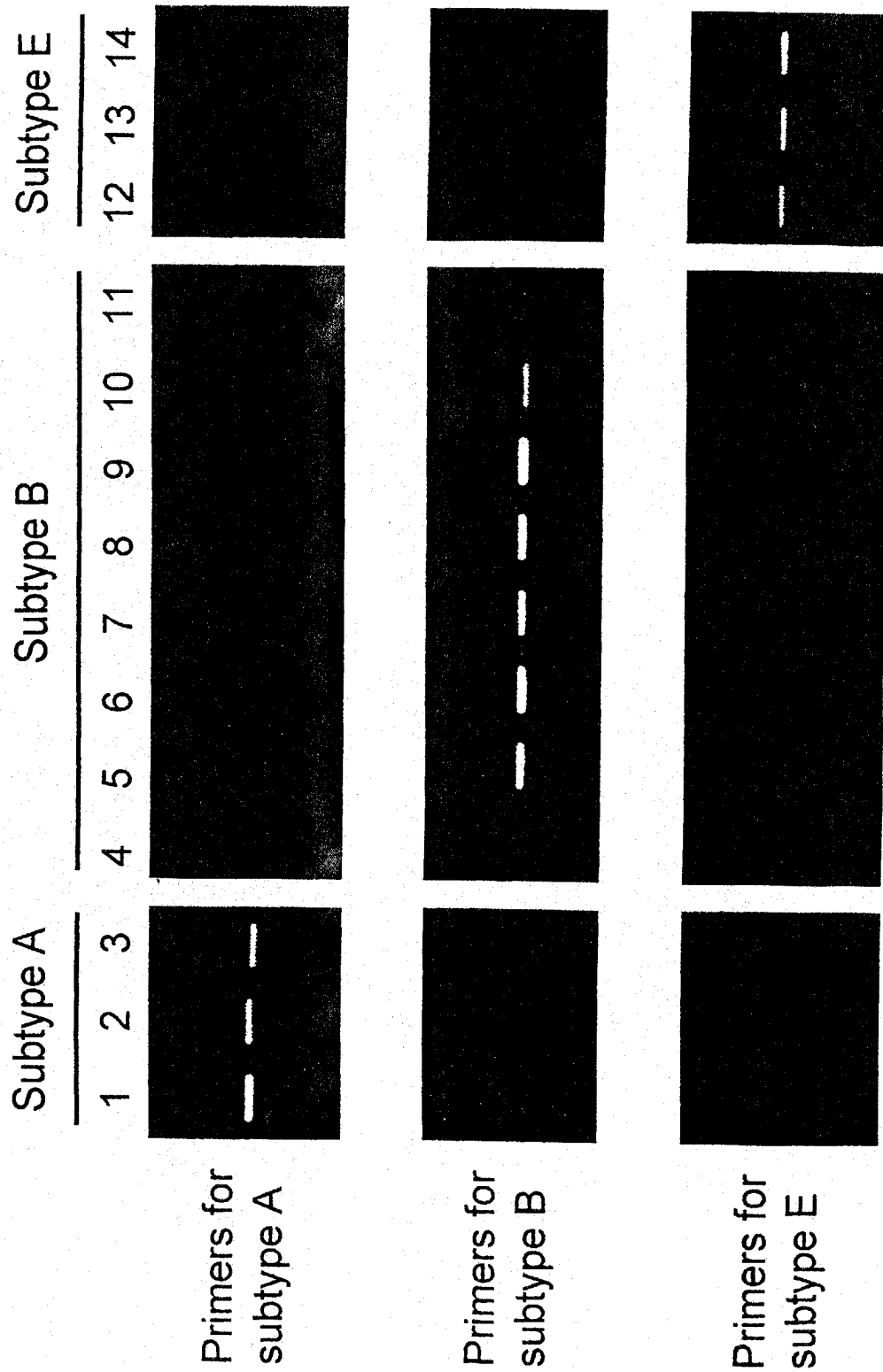
Primers

9AE:	CACAGTACAAATGCACACATG
9B:	CACAGTACAAATGTACACATG
10:	AAATGGCAGTCTAGCAGAAG
11QA:	CTCCTGAGGGTTAGCAAAG
11QE:	CTCCTGAGGGTGGTTGAAAG
11BB:	CTGTGCATTACAATTTCTGG
12A:	GCAATAGAAAAAATTCTCCTC
12B:	ACAGTAGAAAAAATTCCTCCTC
12E:	GCAATAGAAAAAATTCCTCCTC

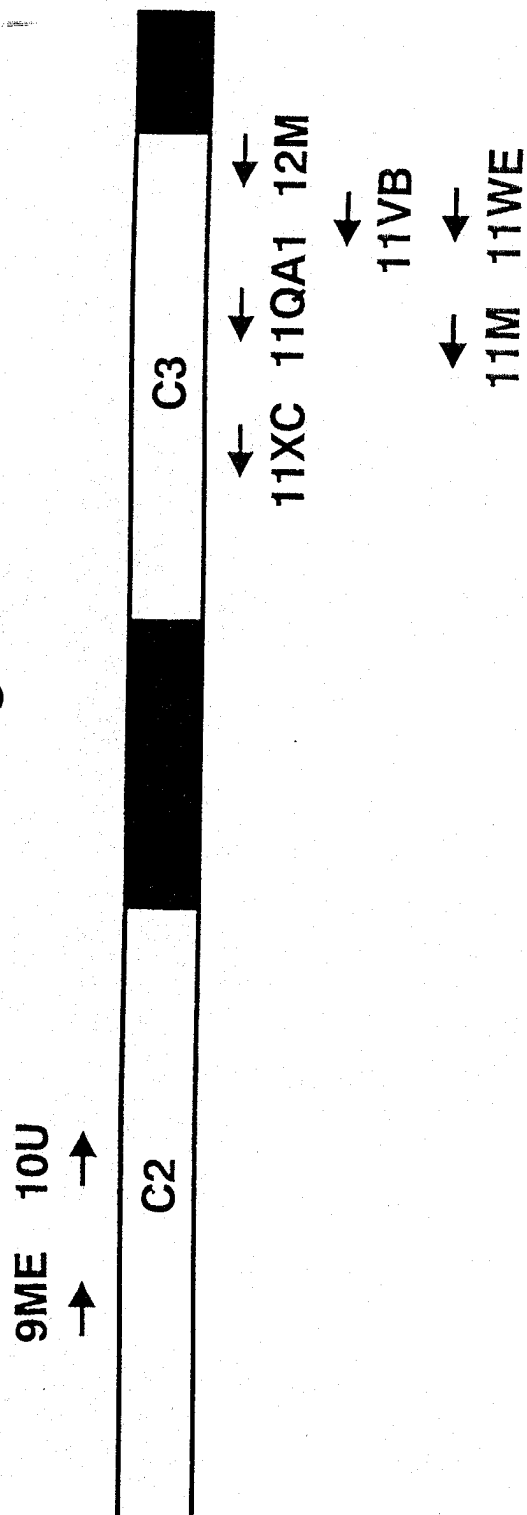
4 / 1 0

Fig. 4

HIV-1 in patients



the *env* gene



5 / 10
Fig. 5

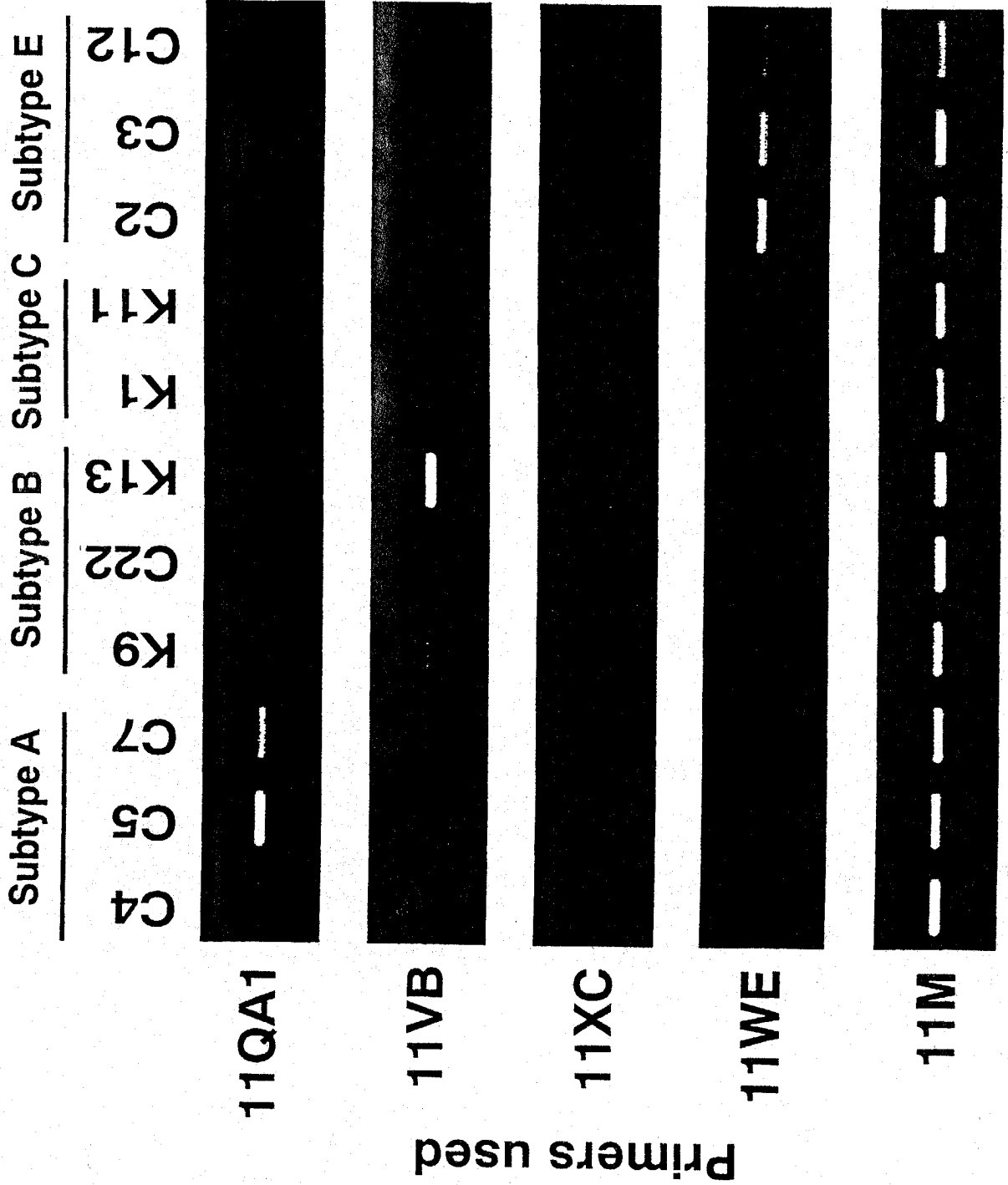
Primers used for		
Subtype	1st PCR	2nd PCR
A	9M/12M	10U/11QA1
B	9M/12M	10U/11VB
C	9M/12M	10U/11XC
E	9M/12M	10U/11WE
All	9M/12M	10U/11M

Primers

9AE:	CACAGTACAATGCACACATG
9B:	CACAGTACAATGTACACATG
10U:	CTGTAAATGGCAGTCTAGC
11QA1:	CTCCTGAGGAGTTAGCAAAG
11VB:	CACAATTAAACTGTGCATTAC
11XC:	TTGTTTTATTAGGGAAGTGTTTC
11WE:	CTCTACAATTAAATGATGCATTG
11LAE:	AATTTCTAGATCCCCCTCCTG
11LB:	AATTTCTGGTCCCCCTCCTG
11LC:	AATTTCTAGGTCCCCCTCCTG
12A:	GCAATAGAAAAATTCTCCTC
12B:	ACAGTAGAAAAATTCCCCCTC

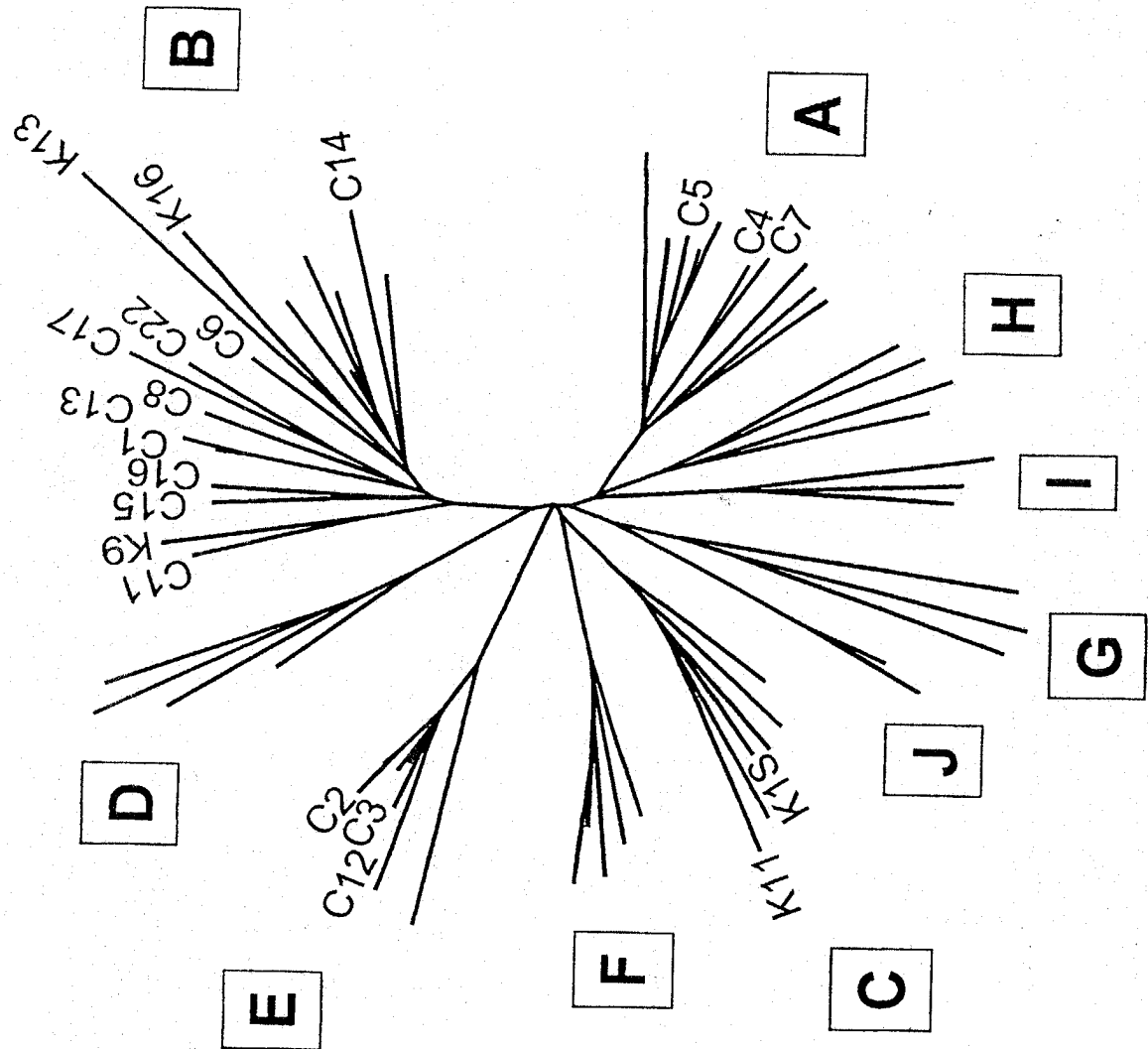
Fig. 6

HIV-1 in patients



7 / 10

Fig. 7



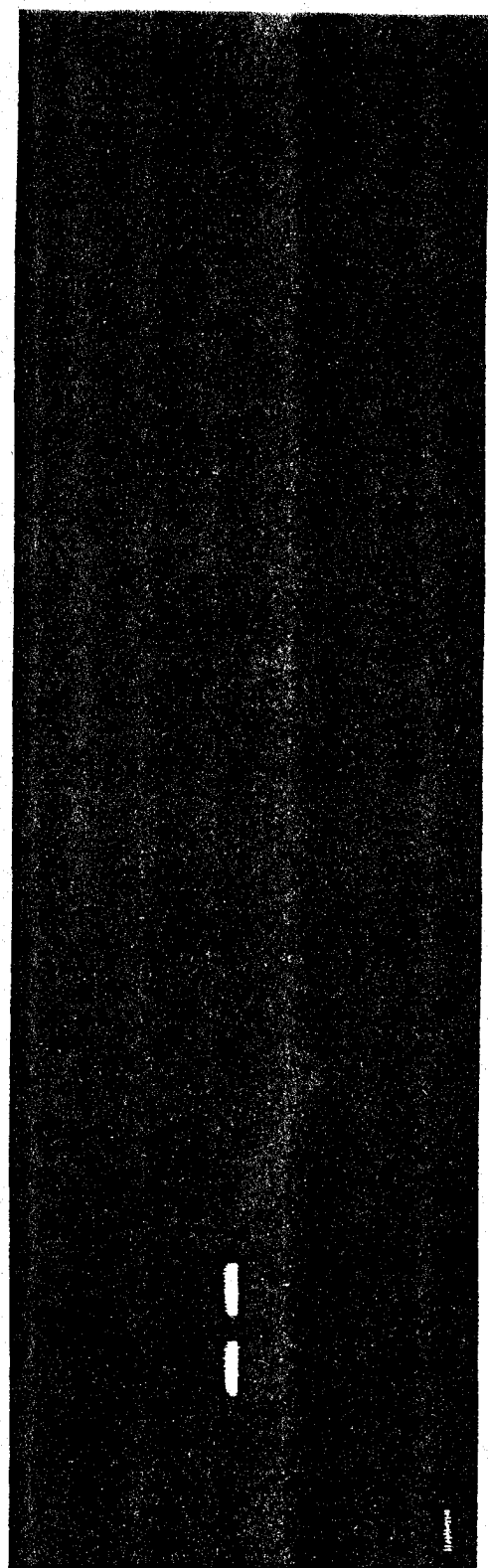
Patient	Subtype	Date	Amino acid at positions relevant to PRL resistance											
			10	20	30	36	46	48	50	53	63	82	84	90
C3	E	8/11/97	L	K	D	I	M	G	I	L	V	I	L	
		6/17/99	F	T	D	I	M	G	I	L	V	I	L	
C4	A	6/9/97	L	I	D	I	M	G	I	N	V	I	L	
		3/11/98	L	I	D	I	M	G	I	N	V	I	L	
C5	A	6/23/97	L	I	D	I	M	G	I	P	V	I	L	
		1/11/99	L	I	D	I	M	G	I	P	V	I	L	
C7	A	7/29/97	L	I	D	I	M	G	I	N	V	I	L	
		9/16/99	L	I	D	I	M	G	I	N	V	I	L	

F i g . 9

	Heterosexual	MSM	Total
Subtype A	2	1	3
Subtype B	6	17	23
Subtype C	2	0	2
Subtype E	6	1	7
Total	16	19	35

10/10

Fig. 10



4320

4361

4269

4081

4378

4589

4317

4494

4727

4309

4017

4441

4488

4480

4091

N1

P1

P2

N2

SEQUENCE LISTING

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<110> KEIO UNIVERSITY

<120> A METHOD FOR HIV-1 SUBTYPING

<130> P00-18

<140>

<141>

<150> JP P11-167736

<151> 1999-06-15

<150> JP P2000-23581

<151> 2000-02-01

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 1

ctcctgaggg gtagcaaag

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 2

ctgtgcatta caatttctgg

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

ctcctgaggg tgggtgaaag

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

aaatggcagt ctagcagaag

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

gcaatagaaa aattctctc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

acagtagaaa aattcccctc

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

gcaatagaaa aattcccctc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

cacagtacaa tgcacacatg

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

cacagtacaa tgtacacatg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

aaatggtagc ctgcagaag

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11

gaatggcagt ttagcagaag

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12

gtcaaatggc agttagcag

20

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13

ctcctgagga tgggtgcaat tt

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 14

ctcctgagga tgggttaaaa at

22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 15

ctcctgagga tgagttaaatt tt

22

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 16

tcctgcagat gagttaaagg

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 17

tcctgaggat ggtttaaagg

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 18

aatttctggg tcccctctg

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 19

aatttctaga tctcctctg

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 20

ctgttaaag gcagtctagc

20

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 21

ctcaactact gttaaattgt ag

22

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 22

ctgttaaattg gcagcctagc

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 23

ctgttaaattg gcagtttagc

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 24

ctgttaaag gtagtctagc

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 25

aatttctaga tcccctcctg

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 26

aatttctagg tcccctcctg

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 27

ctcctgagga gtttagcaaag

20

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 28

cacaattaaa actgtgcatt ac

22

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 29

ttgttttatt agggaagtgt tc

22

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 30

ctctacaatt aaaatgatgc attg

24

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 31

ttctcctcta caattaaagc

20

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 32

ttattgtttt attaggaag tg

22

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 33

tgcatgttaa ttcttagatc tc

22

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 34

tgatgcattg taatttctag

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/48, C12Q1/68, C12Q1/70, G01N33/569, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/48, C12Q1/68, C12Q1/70, G01N33/569, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DBJ/GenSeq,

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SATO, H., et al., "Evolution and Biological Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype E gp120 V3 Sequences following Horizontal and Vertical Virus Transmission in a Single Family", JOURNAL OF VIROLOGY (1999), Vol.73, No.5, pp.3551-3559	1-18
Y	LEMONDIOS, G.K., et al., "Genetic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains from Patient in Cyprus: Identification of New Subtype Designated Subtype I", JOURNAL OF VIROLOGY (1995), Vol.69, No.10, pp.6122-6130	1-18
Y	DUMONCEAUX, J., et al., "Spontaneous Mutations in env Gene of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 NDK Isolate Are Associated with a CD4-Independent Entry Phenotype", JOURNAL OF VIROLOGY (1998), Vol.72, No.1, pp.512-519	1-18
Y	McDONALD, R. A., et al., "Evolution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 env Sequence Variation in Patients with Disease Progression and T-Cell Function", JOURNAL OF VIROLOGY (1997), Vol.71, No.3, pp.1871-1879	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 September, 2000 (29.09.00)Date of mailing of the international search report
10 October, 2000 (10.10.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03896

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BRUISTEN, S., et al. "Detection of HIV-1 distribution in different blood fractions by nucleic acid amplification assays", AIDS Res. Hum. Retroviruses (1993), Vol.9, No.3, pp.259-265	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/48, C12Q1/68, C12Q1/70, G01N33/569, G01N33/50		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/48, C12Q1/68, C12Q1/70, G01N33/569, G01N33/50		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	SATO, H., et al. "Evolution and Biological Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype E gp120 V3 Sequences following Horizontal and Vertical Virus Transmission in a Single Family", JOURNAL OF VIROLOGY, (1999), 第73巻, 第5号, p. 3551-3559	1-18
Y	LEMONDIOS, G.K., et al. "Genetic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains from Patient in Cyprus: Identification of New Subtype Designated Subtype I", JOURNAL OF VIROLOGY, (1995), 第69巻, 第10号, p. 6122-6130	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	29.09.00	国際調査報告の発送日 10.10.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明	4B 9358
電話番号 03-3581-1101		内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	DUMONCEAUX, J., et al. "Spontaneous Mutations in env Gene of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 NDK Isolate Are Associated with a CD4-Independent Entry Phenotype", JOURNAL OF VIROLOGY, (1998), 第72巻, 第1号, p. 512-519	1-18
Y	McDONALD, R.A., et al. "Evolution of Human Immunodeficiency Virus Type 1 env Sequence Variation in Patients with Disease Progression and T-Cell Function", JOURNAL OF VIROLOGY, (1997), 第71巻, 第3号, p. 1871-1879	1-18
Y	BRUISTEN, S., et al. "Detection of HIV-1 distribution in different blood fractions by nucleic acid amplification assays", AIDS Res. Hum. Retroviruses, (1993), 第9巻, 第3号, p. 259-265	1-18